Münster.1933.№46 Med Diss.

Aus der Westfäl. Wilhelms-Universität Münster i. W.

Über den Einfluß des Coffeins auf die Methylenblauentfärbung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i.W.

Vorgelegt

von

Maria Kocks, Zahnärztin

aus

Gladbeck i. Westf.

*

Aus der Westfäl. Wilhelms-Universität Münster i. W.

Über den Einfluß des Coffeins auf die Methylenblauentfärbung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. W.

Vorgelegt

von

Maria Kocks, Zahnärztin

aus

Gladbeck i. Westf.

*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meiner Mutter gewidmet

Dekan: Professor Dr. Herzog
Referent: Professor Dr. Freund

Über den Einfluß des Coffeins auf die Methylenblauentfärbung

Die Einwirkung des Coffeins auf die intermediären Vorgänge des Kohlehydratstoffwechsels ist von Haarmann[1]) und Fischer[2]) untersucht worden. Sie fanden die Milchsäurebildung bei einer Konzentration von 0,2 o/o gehemmt, und zwar sowohl aus den im Gewebe präformierten Kohlehydraten wie aus zugesetztem Glykogen, Glukose und Hexosediphosphorsäure. Diese Stoffwechselwirkung zeigte sich an allen untersuchten Organen mit Ausnahme des Gehirns. Das Gehirn nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als es aus Glukose ohne vorausgegangener Phosphorsäureesterbildung Milchsäure machen kann. Die Milchsäurebildung am Gehirn bei Glukosezusatz wurde durch Coffein nicht gehemmt, gelegentlich sogar gesteigert. Es zeigte sich, daß ein Angriffspunkt des Coffeins, an der es eine starke Hemmung aufweist, die Esterspaltung ist. Diese Hemmung war deutlich bei Hexosemonophosphorsäure und Glycerin-Phosphorsäure. Sie fehlte bei Hexosediphosphorsäure.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, nach anderen Fermentreaktionen zu suchen, die etwa durch Coffein beeinflußt werden. Zur Untersuchung kamen einige Dehydrierungsreaktionen, die mit der Methylenblauentfärbungsmethode nach Thunberg geprüft wurden.

Methodik.

Das Untersuchungsmaterial wurde in ein Reagenzröhrchen eingeführt. Das Röhrchen wurde in der Flamme ausgezogen und nach Herstellung des Vakuums abgeschlossen[3])

Versuchsansätze:

0,2 g Gewebe,
0,4 ccm Methylenblau
0,6 ccm Flüssigkeit

Beispiel einer Versuchsserie:

0,2 g Gewebe,
0,4 ccm Methylenblau, außerdem
1.) 0,6 ccm H_2O (Kontrollversuch)
2.) 0,3 ccm H_2O
0,3 ccm Bernsteinsaures Na
von 3—8 je 0,3 ccm Coffein von 10^{-7} —10^{-2}
statt des Wassers.
Die Coffeinstammlösung enthält 1 g Coffein in 100 ccm H_2O.
Die Coffeinkonzentration ist also einmal 10^{-2}.

---

[1]) W. Haarmann, Habilitationsarbeit, Münster, Wintersemester 1932. (Unveröffentlicht).
[2]) Fischer, Dr.-Dissertation, Münster. (Noch unveröffentlicht).
[3]) A. Hahn und W. Haarmann. Z. f. Biol. 89, 159, 1929.

Die weiteren Verdünnungen wurden so hergestellt, daß jedesmal 10 ccm der Flüssigkeit in ein 100 ccm Meßkölbchen gebracht wurden, welches dann mit Wasser aufgefüllt wurde.

Die Methylenblaulösung enthält 0,02 g Methylenblau in 100 ccm Phosphatpufferlösung von dem Wasserstoffgehalt P H = 7,0 und einem Phosphatgehalt von m/7,5—P_{04}. Die Methylenblaukonzentration beträgt also 1 : 5000.

Thermostatentemperatur = 38°. Von tierischen Geweben wurden verwandt:

Herzmuskulatur von Kaninchen, Hund, Katze und Rind; ferner Skelettmuskulatur von den Vorgenannten, außerdem vom Frosch und Meerschweinchen. Je nach der Fragestellung wurde unausgewaschene und ausgewaschene Muskulatur verwandt. Um die Skelettmuskulatur von ihren Fermenten zu befreien, wurde sie nach sorgfältiger Zerkleinerung dreimal in einem Gefäß mit destilliertem Wasser kräftig geschüttelt und dann durch ein Tuch filtriert. Auf diese Weise wurde der Muskel von dem größten Teil seiner Nährstoffe und Fermente befreit. Erhalten bleiben unter anderem die Fermente, die den Abbau der Bernsteinsäure, Hexosediphosphorsäure und Glycerin-Phosphorsäure vermitteln.

Versuchsergebnisse

Versuchsserie I.

Die ersten Versuchsansätze wurden an unausgewaschener Herzmuskulatur von Kaninchen, Katze und Rind, ferner an Skelettmuskulatur derselben Tiere, außerdem vom Frosch bei Zusatz der verschiedenen Coffeinkonzentrationen angestellt.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle I

Versuchsansätze	Entfärbungszeit in Minuten						
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Versuch IV	Versuch V	Versuch VI	Versuch VII
1.) Kontrollversuch . . .	40	44	12	70	24	9	14
2.) Coffein 10^{-7}	40	43	9	75	28	13	18
3.) „ 10^{-6}	30	24	7	65	23	7	14
4.) „ 10^{-5}	17	26	6	44	22	5	13
5.) „ 10^{-4}	48	29	—	58	43	10	5
6.) „ 10^{-3}	48	34	6	60	44	12	31
7.) „ 10^{-2}	50	60	15	65	71	12	40
Organ	Herz	Herz	Herz	Herz	Herz	Muskel	Muskel
Versuchstier	Kaninchen	Kaninchen	Rind	Katze	Kaninchen	Kaninchen	Frosch

Bei sehr starken Verdünnungen des Coffeins tritt eine Hemmung der Dehydrierungsvorgänge ein, die bei einer Verdünnung von $1 \cdot 10^{-6}$ in eine Beschleunigung umschlägt, und die bei einer

Verdünnung von 1.10^{-5} ein Maximum hat. Nimmt man dann höhere Coffeinkonzentrationen, so nimmt das Entfärbungsvermögen des Gewebes unter der Coffeinwirkung wieder ab und zwar so, daß die höchste Coffeinkonzentration am meisten hemmt. Um feststellen zu können, welche Reaktionen im einzelnen durch Coffein beschleunigt werden, müssen die Versuchsbedingungen geändert werden.

Versuchsserie II.

Die Milchsäure ist das wesentlichste Spaltungsprodukt des anaeroben Kohlehydratstoffwechsels. Die nächste Versuchsreihe ist mit Lactatzusatz am unausgewaschenen Skelettmuskel ausgeführt.

Tabelle II

Versuchsansätze	Entfärbungszeit in Minuten				
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Versuch IV	Versuch V
1.) Kontrollversuch	21	23	39	20	20
2.) Lactat	24	30	44	25	23
3.) „ + Coffein 10^{-9}	25	–	—	—	—
4.) „ + „ 10^{-8}	24	—	—	–	—
5.) „ + „ 10^{-7}	23	29	40	24	22
6.) „ + „ 10^{-6}	20	22	35	21	20
7.) „ + „ 10^{-5}	16	–	29	17	18
8.) „ + „ 10^{-4}	28	19	30	17	19
9.) „ + „ 10^{-3}	29	29	40	23	23
10.) „ + „ 10^{-2}	30	32	45	25	26
Organ	Muskel	Muskel	Muskel	Muskel	Muskel
Versuchstier	Kaninchen	Kaninchen	Frosch	Kaninchen	Hund

Lactatzusätze ohne Coffein hemmten die Methylenblauentfärbung gegenüber dem Kontrollversuch. Bei kombiniertem Zusatz von Lactat und Coffein war zunächst noch eine Hemmung der Dehydrierungsvorgänge gegenüber dem Kontrollversuch vorhanden; aber schon bei einer Verdünnung des Coffein von 10^{-6} setzte eine Beschleunigung der Methylenblauentfärbung ein. Die höheren Coffeinkonzentrationen bewirkten dann wieder eine Hemmung der Dehydrierungsvorgänge. Bei Zusatz von Lactat und Coffein ist die Coffeinhemmung noch stärker als in den ersten Versuchen ohne Lactatzusatz.

Die Milchsäure-Dehydrierung wird also durch hohe Coffeinkonzentrationen gehemmt und durch niedere Konzentrationen beschleunigt.

Man muß annehmen, daß Glukose nicht direkt dehydriert wird, sondern erst nach vorheriger Spaltung des Hexosemoleküls zu

Verbindungen mit drei Kohlenstoffatomen. Das erste Spaltungsprodukt ist Methylglyoxal. [1])

Das Methylglyoxal geht unter anaeroben Bedingungen unter Wasseraufnahme durch ein spezifisch wirkendes Ferment, die Methylglyoxalase, nach Art einer inneren Camizsoroschen Reaktion in Milchsäure über. Bei Gegenwart von Sauerstoff dagegen erfolgt Abbau des Methylglyoxals zu Brenztraubensäure. Durch Schädigung der Methylglyoxalase z. B. durch Vorbehandlung mit Toluol, wodurch der Uebergang des Methylglyoxals zu Milchsäure verhindert wird, kommt es zu einer Anhäufung von Methylglyoxal bei der Spaltung von Hexosediphosphorsäure. Hahn und Haarmann konnten nach Entfernung der Methylglyoxalase durch starkes Auswaschen des Gewebes mit H_2O Brenztraubensäure bei Verwendung von Methylenblau als Wasserstoffacceptor nachweisen. Zucker kann also zu Brenztraubensäure abgebaut werden, ohne die Milchsäurestufe zu passieren.

Tabelle III

Versuchsansätze	Entfärbungszeit in Minuten			
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Versuch IV
1.) Kontrollversuch	12	29	20	25
2.) Glukose	17	31	23	26
3.) Glukose + Coffein 10^{-10}	17	—	—	—
4.) „ + „ 10^{-9}	17	—	—	—
5.) „ + „ 10^{-8}	16	—	—	—
6.) „ + „ 10^{-7}	10	22	9	18
7.) „ + „ 10^{-6}	10	17	7	15
8.) „ + „ 10^{-5}	9	17	7	14
9.) „ + „ 10^{-4}	18	25	16	19
10.) „ + „ 10^{-3}	20	26	18	22
11.) „ + „ 10^{-2}	22	35	25	30
Organ	Herz	Herz	Herz	Herz
Versuchstier	Kaninchen	Kaninchen	Hund	Katze

Meine Versuche mit Glukose als Zusatz ergaben, daß die Methylenblauentfärbung bei Zusatz von Glukose allein gegenüber dem Kontrollversuch gehemmt wurde, wie wir es gleichfalls bei Zusatz von Lactat gesehen haben. Bei kombiniertem Zusatz von Glukose und Coffein trat bei einer Verdünnung von 1.10^{-7} eine Beschleunigung der Methylenblauentfärbung ein, die bei einer Verdünnung von 1.10^{-5} ein Maximum hatte, und die von da in

[1]) W. Haarmann, Habilitationsarbeit 1932.

eine Hemmung der Methylenblauentfärbung umschlug. Die stärkste Hemmung war erreicht bei einer Konzentration von $1 . 10^{-2}$.

Versuchsserie III.

Tabelle IV

Versuchsansätze	Entfärbungszeit in Minuten	
	Versuch I	Versuch II
1.) Kontrollversuch	—	—
2.) Hexosediphosphorsaures Na + H_2O	19	38
3.) „ „ + Coffein 10^{-7}	22	46
4.) „ „ + „ 10^{-6}	20	41
5.) „ „ + „ 10^{-5}	16	35
6.) „ „ + „ 10^{-4}	26	51
7.) „ „ + „ 10^{-3}	28	56
8.) „ „ + „ 10^{-2}	30	58
Organ	Muskel	Muskel
Versuchstier	Kaninchen	Katze

Tabelle V

Versuchsansätze	Entfärbungszeit in Minuten		
	Versuch I	Versuch II	Versuch III
1.) Kontrollversuch	—	—	—
2.) Glycerinphosphors. Na + H_2O	25	36	96
3.) „ „ + Coffein 10^{-7}	25	36	66
4.) „ „ + „ 10^{-6}	24	32	68
5.) „ „ + „ 10^{-5}	21	31	68
6.) „ „ + „ 10^{-4}	23	48	86
7.) „ „ + „ 10^{-3}	25	55	90
8.) „ „ + „ 10^{-2}	38	83	96
Organ	Muskel	Muskel	Herz
Versuchstier	Kaninchen	Kaninchen	Rind

Tabelle VI

Versuchsansätze	Entfärbungszeit in Minuten			
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Versuch IV
1.) Kontrollversuch	—	—	—	—
2.) Bernsteinsaures Na + H_2O	52	35	30	23
3.) „ „ + Coffein 10^{-9}	52	—	—	—
4.) „ „ + „ 10^{-8}	52	—	—	—
5.) „ „ + „ 10^{-7}	46	25	25	21
6.) „ „ + „ 10^{-6}	40	25	19	29
7.) „ „ + „ 10^{-5}	46	30	25	29
8.) „ „ + „ 10^{-4}	50	30	27	30
9.) „ „ + „ 10^{-3}	52	35	30	31
10.) „ „ + „ 10^{-2}	54	35	35	57
Organ	Muskel	Muskel	Muskel	Herz
Versuchstier	Hund	Kaninchen	Meerschweinchen	Rind

Es wurde gezeigt, daß der Abbau der Milchsäure und Glukose unter Verwendung von Methylenblau durch hohe Coffeinkonzentrationen gehemmt und durch niedere Konzentrationen beschleunigt wird. Jetzt soll untersucht werden, ob auch andere Fermentreaktionen durch Coffein beeinflußt werden. Zur besseren Uebersicht wurde Skelettmuskulatur von Kaninchen und Meerschweinchen verwandt, die vorher kräftig mit Wasser ausgewaschen waren. Durch das Auswaschen wurden die vorhandenen Nährstoffe und Fermente größtenteils entfernt. Ein solcher Muskel hat das Dehydrierungsvermögen für Milchsäure verloren. Hahn und Haarmann zeigten, daß bei Verwendung von Methylenblau als Wasserstoffacceptor von einem derart vorbehandelten Gewebe Bernsteinsäure zu Fumarsäure, Hexosediphosphorsäure zu Brenztraubensäure abgebaut werden. Glycerin-Phosphorsäure wird nicht in Brenztraubensäure übergeführt, wohl aber dehydriert. Untersucht wurden die Natriumsalze der Glycerin-Phosphorsäure, der Bernsteinsäure und der Hexosediphosphorsäure in 1prozentiger Lösung. Die Versuche zeigten eindeutig, daß die Dehydrierung dieser drei Verbindungen durch Coffein in der gleichen Weise beeinflußt wird wie bei Zusatz von Lactat und Glukose und zwar so, daß bei höheren Verdünnungen eine Beschleunigung eintritt, die bei Coffeinkonzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ in eine Hemmung umschlägt, die bei $1 \cdot 10^{-2}$ am stärksten ist. Stärkere Verdünnungen von Coffein von $1 \cdot 10^{-9}$ bis 10^{-7} bewirken eine Beschleunigung der Dehydrierungsgeschwindigkeit. In den Tabellen 2, 3 und 6 wurden die Grenzkonzentrationen des Coffeins festgestellt, die schon beschleunigend wirken. Diese liegen bei Zusatz von Bernsteinsäure bei einer Konzentration von ca. $1 \cdot 10^{-7}$, bei Zusatz von Lactat bei ca. $1 \cdot 10^{-8}$ und bei Zusatz von Glukose auch bei $1 \cdot 10^{-8}$. Das Optimum der Wirkung d. h. Beschleuni-

gung der Dehydrierungsvorgänge liegt bei einer Coffeinkonzentration $0{,}2 \cdot 10^{-5}$. Nehmen wir 0,1 g Coffein als Therapeutische Dosis beim Menschen an, so ist die Coffeinkonzentration bei 40 kg Weichteilen $= \frac{0.1\ g}{40\,000} = 0{,}25 \cdot 10^{-5}$.

Die maximale Förderung der Dehydrierungsvorgänge würde also mit der Therapeutischen Dosierung gut übereinstimmen.

Zusammenfassung

Es wurde die Beeinflussung der Dehydrierungsvorgänge durch Coffein untersucht. Die Dehydrierung der Milchsäure, der Glukose, der Bernsteinsäure, Glycerin-Phosphorsäure und Hexosediphosphorsäure wird durch hohe Coffeinkonzentrationen gehemmt, durch schwache Konzentrationen beschleunigt. Das Optimum der Hemmungswirkung des Coffeins liegt bei den höheren Coffeinkonzentrationen, die nach Untersuchungen von Haarmann und Fischer die Milchsäurebildung hemmen. Bei niedrigen Coffeinkonzentrationen, die die Milchsäurebildung unbeeinflußt lassen, wird die Dehydrierung der vorgenannten drei Verbindungen beschleunigt. Die Beeinflussung der Dehydrierungsgeschwindigkeit unter dem Einfluß von Coffein verläuft also der Beeinflussung der Milchsäurebildung nicht parallel.

Lebenslauf

Ich wurde am 24. November 1907 in Gladbeck i. W. geboren, besuchte in Gladbeck die Deutsche Oberschule und in Dorsten die Realgymnasiale Studienanstalt und machte an letzterer im März 1928 die Reifeprüfung. Hierauf wandte ich mich dem zahnärztlichen Studium zu, bestand in Münster im Winter 1929/30 meine zahnärztliche Vorprüfung und im Winter 1931/32 das zahnärztliche Staatsexamen.

Buersche Druckerei G.m.b.H., Buer i. W.